

## 細胞融合によるダイコンの雄性不稔細胞質一回復遺伝子のナタネへの導入に関する研究

著者	酒井 隆子
号	501
発行年	1994
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10097/16367">http://hdl.handle.net/10097/16367</a>

氏 名(本籍)      <sup>さか</sup>酒      <sup>い</sup>井      <sup>たか</sup>隆      <sup>こ</sup>子

学 位 の 種 類      博      士      (農      学)

学 位 記 番 号      農      第      5 0 1      号

学位授与年月日      平 成 6 年 5 月 12 日

学位授与の要件      学位規則第4条第2項該当

学 位 論 文 題 目      細胞融合によるダイコンの雄性不稔細胞  
質一回復遺伝子のナタネへの導入に関する研究

論文審査委員(主 査)      教 授      日 向 康 吉  
   教 授      山 谷 知 行  
   教 授      亀 谷 壽 昭

# 論文内容要旨

## 序論

油料ナタネ (*Brassica napus*)は広く世界に栽培されており、パームヤシ、ダイズなどと並ぶ主要な油糧作物である。ナタネにおいて一代雑種品種の開発は、育種の1つの大きな目標である。一代雑種品種の開発では、採種の効率化のため雄性不稔性や自家不和合性を利用した採種系が必要とされている。採種系の代表的なものとして細胞質雄性不稔 (cytoplasmic male sterility; CMS)の利用が挙げられる。ナタネでは実用的な採種系の開発が遅れており、いまだ自殖品種を上回るF<sub>1</sub>品種はできていない。

本研究では、ナタネに新しいCMS採種系をつくることを目的として、まずダイコンに見いだされたCMS細胞質 (コセナCMS) を非対称融合によってナタネに導入した。さらに得られたサイブリッドのミトコンドリアゲノムの構成を調べた。最後に、ダイコンのCMS採種系をナタネで確立するために、回復遺伝子を持つダイコン系統を用いて非対称融合を行った。



Fig. 1 Flower and flower organ of the cybrid between kosena cms radish and *B. napus*.

# 1、非対称融合によるコセナCMSのナタネへの導入

コセナダイコン集団中に池谷氏によって発見されたコセナCMSをX線とIOAを用いた非対称融合でナタネに導入した。

コセナダイコンCMS系統の無菌苗から葉肉プロトプラストを単離し、一方ナタネ品種ウェスターの下胚軸からプロトプラストを単離した。細胞質供与体であるコセナCMSプロトプラストには、染色体の脱落を促進する目的で60 KradのX線を照射し、細胞質受容体であるナタネプロトプラストは、分裂を阻害するために10 mMのヨードアセトアミド (IOA) で処理した。これらのプロトプラストは40%のポリエチレングリコールを用いて融合処理を行い、ナタネプロトプラストの再生系を用いて融合個体を再生させた。

再生した植物の花の形態、花色、染色体数について調査したところ、雄性不稔で黄色の花を持ち、ナタネ型の染色体数 ( $2n = 38$ ) を持つ個体が10個体中2個体得られた (Fig. 1, Table 1: 個体番号12-9、18-3)。この2個体は、次世代のすべてが雄性不稔であり、細胞質雄性不稔であることを確認した。このことは、ダイコンのプロトプラストにX線を照射し非対称融合することにより染色体の脱落が促進され、戻し交配を経ること無しに短期間でコセナCMSがナタネに導入されたことを示す。

得られた再生個体について、ミトコンドリアDNA (mtDNA) をサザンハイブリダイゼーションを用いて調べたところCMS個体は両親のmtDNAの組換え型または混合型を持つことがわかった。

Table 1

Chromosome numbers and flower morphology of the plants derived from protoplast fusion between the *R. sativus* kosena cms line and *B. napus* cv. Westar.

Plant #	Petal color	Chromosome number (2n)	Staminal phenotype	Fertility
6-5	yellow	57	B	Male sterile
6-8	yellow	56	C	Fertile
6-14	yellow+white <sup>1)</sup>	84	A	Male sterile
6-15	cream	50	A	Male sterile
6-16	yellow	60	A	Male sterile
12-9	yellow	38	B	Male sterile
12-12	yellow+white <sup>1)</sup>	53	A	Male sterile
18-3	yellow+white <sup>1)</sup>	38	B	Male sterile
18-4	cream	46	B	Male sterile
18-6	cream	47	B	Male sterile

Staminal phenotypes of the regenerated plants were classified as Type A, normal long filaments and shrunken anthers; Type B, stunted filaments and empty anthers; and Type C, identical to those of *B. napus*.

1) Yellow petals with white sectors

## 2 サイトプラストをもちいたコセナ C M S 細胞質のナタネへの導入

X線を用いた非対称融合によって、融合個体のダイコン染色体を脱落させることができることがわかったが、その効率は必ずしも良いとは言えない。ダイコンゲノムはナタネゲノムと高い相同性をもつことは従来の属間交配の実験から良く知られている。そのために細胞融合でもダイコンゲノムの脱落が起こりにくいと思われた。そこで、プロトプラストを超遠心分離にかけることによって核を脱落させた脱核細胞（サイトプラスト）を細胞質供与体とし、サイトプラスト-プロトプラスト融合を行った。物理的にダイコンゲノムを排除し、細胞質供与体にするることにより、ダイコンゲノムを持たないサイブリッドを形成させることが検討した(Fig. 2)。

Percoll /mannitol  
discontinuous density  
gradient

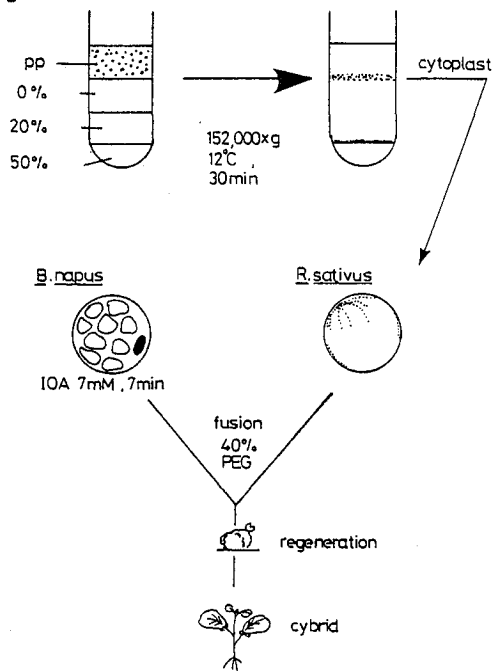


Fig. 2 Schematic representation of  
cytoplasm isolation and the following  
fusion experiment. pp:protoplast,  
N:nucleus

まずダイコン下胚軸プロトプラストからサイトプラストを単離する条件を検討した。下胚軸プロトプラストは単離後90%、50%、20%のパーコールを含むマニトール溶液の不連続密度勾配遠心法によって脱核処理した。遠心度、遠心時間を検討し、脱核細胞単離の条件を決定した。12℃、152000Gで30分遠心分離した後、サイトプラスト画分を調べると細胞の80-95%が脱核しており、 $10^8$ 個のプロトプラストから $5 \times 10^5$ 個のサイトプラストを得ることができた(Fig. 2)。

サイトプラストは単離後すぐにIOA処理したナタネプロトプラストと融合処理し、ナタネプロトプラストの再生系を用いて再生個体を得た。得られた17の融合個体のうち10個体がナタネ型染色体数を示した。この結果をX線を用いた非対称融合の場合と比べるとサイトプラストを用いた場合の方が、ナタネ型染色体を示す個体が圧倒的に多く、この方法が細胞質供与体の染色体を選択的に排除するのに有効であることが分かった(Fig. 3)。

ナタネ型染色体数を示した10個体のうち、1個体は雄性不稔を示し、残り9個体は可稔であった。これらのmtDNAを4種類のmtDNAプローブを用いて調べたところ不稔を示した1個体を含む4個体が組換え型のフラグメントを持ち、残りはナタネ型を示した。このことは、サイトプラスト-プロトプラストの融合においてもCMSはナタネに導入され、さらにmtDNAは組換えを起こしたことを示していた。

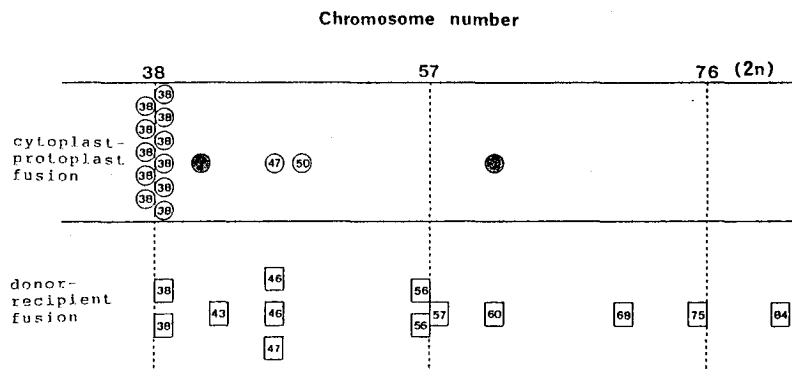


Fig. 3 Chromosome number of the fusion products of the cytoplast-protoplast and donor-recipient fusion. The plants derived from the cytoplast-protoplast fusion and those from the donor-recipient fusion were represented by circles and squares, respectively. They are arranged according to the chromosome number along horizontal axis. The numbers described in marks indicate the chromosome number of each fusion products. The data on the chromosome number of donor-recipient fusion products are cited from Table 1. Hatched circles indicate chimeric plants.

### 3 サイブリッドの後代にみられたミトコンドリアDNAの変動

非対称融合で作出した2つのサイブリッド(12-9、18-3)をナタネで戻し交配し、戻し交配第一代( $BC_1$ )のミトコンドリア $F_1F_0$ ATPase遺伝子(atpA)のサザンハイブリダイゼーションパターンを調べた。atpAパターンは単純な母性遺伝を示さず後代の個体間で変動していた(Fig. 4)。そこで、この変動がどのようにして起きたのかを考察した。まず、サザンハイブリダイゼーションによって、この変動が $BC_2$ 以降も続くのか、またサイブリッド個体の各部位ではどうなのかを調べた。

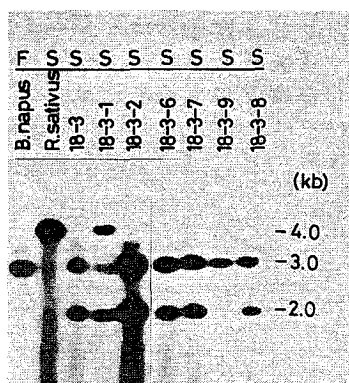


Fig. 4 Southern hybridization analysis of total cellular DNA of cybrids and their first backcrossed progeny ( $BC_1$ ). BamHI- digested total cellular DNAs were separated by 0.7% agarose gel and transferred onto a nylon membrane and hybridized with  $^{32}$ P-labeled *atpA* as a probe. *B. napus* cv. Westar (lane 1); *R. sativus* koseana cms line (lane 2);  $R_0$  cybrid 18-3 (lane 3); and  $BC_1$  progeny (lane 4 to 9). F and S indicates male fertile and male sterile flowers, respectively. About 1 g of total cellular DNA was loaded on each lane. Fragment sizes are given in kb.

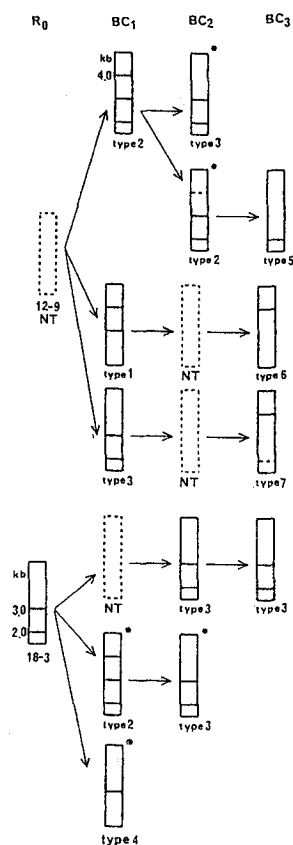


Fig. 5 Schematic representation of Southern hybridization patterns of the total DNAs of the cybrids ( $R_0$ ) and their backcrossed progeny siblings ( $BC_1$ ,  $BC_2$ , and  $BC_3$ ). BamHI-digested DNAs were hybridized with *Pea atpA* as the probe. Hybridization patterns are classified as 7 types according to the *atpA* patterns. Dashed line: a faint hybridization signal. Fragment sizes are given in kb. NT: not tested.

a t p A パターンの変動は、ダイコン型 4.0 kb, ナタネ型 3.0 kb, 及び組み換え型 2.0 kb の 3 本のフラグメントの量的な変化によって起こり、少なくとも B C<sub>3</sub> 世代まで続いていた (Fig. 5)。一方サイブリッド個体の各部位 (つぼみ及びプロトクローン) は、まったく同じ a t p A パターンを示した。

サザンハイブリダイゼーションによって観察された a t p A のパターンの変動は、ミトコンドリアサブゲノムの量的変動によるものであると考え、P C R 法を用いてサブゲノムを検出することを試みた。サザンハイブリダイゼーションを行うとダイコン型フラグメントはサイブリッド個体 (18-3) およびその後代では検出されない (Fig. 6A)。そこでダイコン型フラグメントを特異的に認識する D N A 配列をプライマーに用いて、サイブリッド個体 (R<sub>0</sub>) 及びその B C<sub>2</sub>, B C<sub>3</sub> 世代の個体で P C R を行った。調べたすべての個体にバンドの増幅がみられ、ダイコン型フラグメントの存在を示していた (Fig. 6B)。このことから、細胞融合によって得られたサイブリッドには、ダイコン型フラグメントを含む量比の少ないミトコンドリアサブゲノムが存在し、それらは配偶子を経ても維持されていることがわかった。しかし a t p A を含むサブゲノムの量的変動は、サイブリッドの安定性には影響を及ぼさないと思われた。

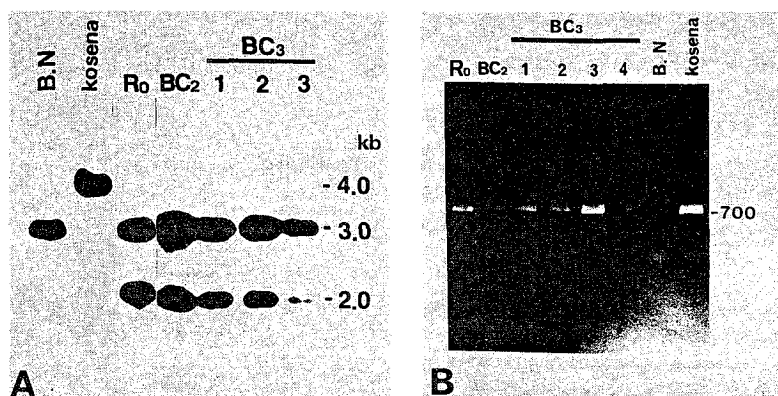


Fig. 6 Southern hybridization (A) and PCR (B) analysis of the mtDNA of *Raphanus sativus* (kosena), *B. napus* (B.N), its cybrid 18-3 (R<sub>0</sub>), a second backcrossed plant (B C<sub>2</sub>) and the third backcrossed plants 18-3-10-1-1, -2, -3, and -4 (B C<sub>3</sub> 1 to 4). A: BamHI-digested mitochondrial DNAs were probed with the cloned atpA coding region of the kosena cms radish. B: EtBr staining pattern for the PCR amplified samples. All DNAs were loaded 4 µg per lane.



## 4 細胞融合によるダイコン回復遺伝子のナタネへの導入

コセナCMS採種系をナタネで確立するためにダイコン回復遺伝子を非対称融合を用いてナタネに導入した。コセナ集団より分離したダイコン回復系を回復遺伝子の供与体とした。第1章で作出したコセナCMSを持つナタネ(CMSナタネ)のBC<sub>1</sub>世代種子の下胚軸プロトプラスト及びダイコン回復系の無菌苗プロトプラストをそれぞれ融合の材料とした。CMSナタネには7mMのIOA処理を、ダイコン回復系には60KradのX線処理を行い40%のPEGを用いて融合処理した。融合細胞をナタネプロトプラストの再生系を用いて培養し、301個の融合個体(R<sub>0</sub>世代)を得た。その内13個体が花粉稔性を示した。この花粉稔性が、回復遺伝子によるものかどうかをナタネへの検定交配によって調べた。

検定交配で種子が得られた6個体中3個体が回復遺伝子を持つと思われる分離を示し、うち1個体はCMSナタネを回復することができた。以上より、ダイコンの核に支配される回復遺伝子は非対称融合によってナタネに導入され、その遺伝子は花粉を経て後代に遺伝したことが確認された(Table 2)。

Table 2

Characterization of fertile R<sub>0</sub> plants derived from fusion experiments between the *B. napus* cybrid and the radish Rf line.

R <sub>0</sub> (#)	Flower color	Viable pollen grains (%)	Segregation in BC <sub>1</sub>		Radish Rf gene
			cross <sup>1)</sup>	S : F <sup>2)</sup>	
71	white	19	cmsx71	25:12	+
347	yellow	83	cmsx347	15:0	-
549	yellow	80	cmsx549	16:0	-
7	white	0 (pollen grain+) <sup>3)</sup>	7xB.napus	6:3	+
42	yellow	64	42xB.napus	13:0	-
151	cream	8.4	151xB.napus	3:3	+

1) Test crosses for identification of the radish restorer gene. cmsxR<sub>0</sub> indicates cross between *B. napus* cms line and a fusion product as pollen parent. In the R<sub>0</sub> x *B. napus* crosses, *B. napus* cv. Westar was used as a pollen parent.

2) S and F indicate male-sterile and male-fertile, respectively.

3) This plant had empty pollen grains.

稔性が回復したBC<sub>1</sub>世代の染色体数を調べたところR<sub>0</sub>世代に比べ染色体数の減少がみられた。さらににR<sub>0</sub>に存在していたダイコンの遺伝子（白花、アイソザイムPGI）は、一部のBC<sub>1</sub>個体では脱落していた(Table 3)。

Table 3  
Characterization of the fertile BC<sub>1</sub> progeny of cybrid #71

BC <sub>1</sub> (#)	Percentage of viable pollen grains	Number of chromosomes	Radish nuclear markers			Number of seeds per pod (mean)
			Rf	PGI <sup>1)</sup>	White petal <sup>2)</sup>	
84	23.6	47	+	+	+	4.57
82	8.6	40	+	-	-	0.34
35	14.6	44	+	+	+	0.78
89	26.5	40	+	-	+	1.35
33	68.1	40	+	-	-	n.t.
44	57.9	44	+	+	+	2.73
49	2.4	n.t.	+	-	+	2.50

n.t.: Not tested.

1) Presence (+) or absence (-) of the radish isozyme of phosphoglucosomerase-2.

2) +, White or creamy petals; -, yellow petals.

## 5 まとめ

本研究ではダイコンで見いだされたコセナCMS細胞質と核支配の形質である回復遺伝子を非対称融合によってナタネに導入できることを実証した。そして従来法によればこれらの形質は戻し交配を繰り返して、長い年月をかけてナタネに導入されたものであるが非対称融合を用いることにより導入期間を大幅に短縮できることを示した。ナタネに導入されたコセナCMSの採種系は育種的に利用価値が高いと考えられる。一方サイブリッドのミトコンドリアDNAは複雑なゲノム構成を示し、組換えによる変異のほかにサブゲノムの量的変動が起きていることを示唆した。しかしサブゲノムが量的に変動していてもCMSは安定であり、サイブリッドは実用的に問題はないと思われる。本研究で得たCMS一回復系のナタネはCMS及び回復遺伝子の機能を分子レベルで理解して行くための有用な素材となると思われる。

## 論文審査の要旨

本研究は、ダイコンの雄性不稔性細胞質とその回復系統をプロトプラスト融合の手法を駆使してナタネに導入して、ナタネの一代雑種品種育成のための主材料である細胞質雄性不稔性系統と回復系統を作成したものである。

まず雄性不稔性コセナダイコンの下胚軸とナタネ品種ウエスターの葉肉細胞からプロトプラストを得、前者にはX線照射、後者にはヨードアセトアミド処理を行った後に、ポリエチレングリコール法によりプロトプラストの非対称融合を行い、ダイコンのミトコンドリアを持つナタネを選抜育成した。なお、この細胞質雑種は組換え型または混合型のミトコンドリアを持つことをサザン分析法で確かめている。

次いで、この融合方法をさらに改良するためにサイトプラストを利用することを試みた。ダイコンのプロトプラストに超遠心処理を施し、核のないサイトプラストを作成する技術を検討して、それを得ることに成功した。そして、ダイコンのサイトプラストとナタネのプロトプラストを融合して、細胞質を置換した植物体を得る技術開発に成功し、X線法との長所・短所を比較した。なお、この場合にもミトコンドリア DNA は組換えを起こしていることを示した。

以上の実験からプロトプラスト融合後の植物においては、両親にないミトコンドリア断片が出現することを指摘したが、それが後代にどの様に伝達されるかは明らかではなかった。本研究ではこれらの DNA が微量ながら有性生殖過程を経ても子孫に伝わることを PCR 法を用いて明らかにし、細胞質雑種の特異性を指摘した。なお、この微量の DNA は雄性不稔性を引き起こすことはなかった。

これらの研究からある種の細胞質を別種に短期間に置換するのに、プロトプラスト融合が極めて有効であることを実証した。

本研究ではさらに、一代雑種品種育成のために必要なダイコンの核に存在する回復遺伝子をナタネに置換するにもプロトプラスト非対称融合法が利用出来ると考え、それを実証した。

以上、本研究はプロトプラスト非対称融合法を用いて、一代雑種品種育成のための細胞質と核遺伝子の置換を短期間に実行できることを実証した研究であり、新品種開発技術に新しい知見を与えたものである。よって、本研究者は博士（農学）を授与されるに値すると判定した。